

УДК 616-006.6:612.086.2:599.323.4

## МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ВОЗДЕЙСТВИЯ АЭРОЗОЛЬНОЙ ВНУТРИБРЮШИННОЙ ХИМИОТЕРАПИИ ПОД ДАВЛЕНИЕМ НА КАРЦИНОМУ У КРЫС

**Крыжановская Е.А., Юкина Г.Ю., Беляев М.А., Захаренко А.А., Рыбальченко В.А.,  
Томсон В.В., Сухорукова Е.Г., Палтышев И.А., Вервекин И.В.**

*Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет  
им. акад. И.П. Павлова, Санкт-Петербург, e-mail: pipson@inbox.ru*

Проведено исследование метода аэрозольной внутрибрюшинной химиотерапии под давлением на перевитый крысам линии Вистар перитонеальный канцероматоз. Перитонеальный канцероматоз моделировали с использованием штамма опухоли яичника. Для развития перитонеального канцероматоза животным вводили внутрибрюшинно  $1 \times 10^7$  опухолевых клеток. После фиксации материала в 10% формалине и стандартной гистологической методики, методом световой микроскопии изучали материал аутопсий крыс с перевитой опухолью без лечения и материал биопсий и аутопсий крыс с лечением методом аэрозольной внутрибрюшинной химиотерапии под давлением с применением цисплатина. Животные без лечения погибали на 7–14 сут. После лечения методом аэрозольной внутрибрюшинной химиотерапии под давлением с применением цисплатина продолжительность жизни животных увеличилась. Морфологический анализ аутопсийного материала леченых животных показал, что практически весь сальник имеет обычное строение со слабо выраженной воспалительной инфильтрацией. Опухолевая ткань наблюдается в единичных фрагментах ткани в виде мелких фокусов гомогенных некротических масс с примесью эритроцитов и единичными дегенеративными опухолевыми клетками. Таким образом, наблюдается развитие частичного регресса опухолевого процесса с уменьшением объема опухолевой ткани в брюшной полости и значительное снижение активности воспалительного процесса, что в совокупности привело к увеличению продолжительности жизни лабораторных животных. Однако сохранился метастатический процесс (метастаз в лимфатический узел и опухолевые эмболы в сосудах), вносящий вклад в опухолевую интоксикацию с развитием дистрофии паренхиматозных органов.

**Ключевые слова:** перитонеальный канцероматоз, асцитная карцинома, аэрозольная внутрибрюшинная химиотерапия под давлением, цисплатин, морфологическая оценка

## MORPHOLOGICAL ASSESSMENT OF THE EFFECTS OF AEROSOL INTRAPERITONEAL CHEMOTHERAPY UNDER PRESSURE ON EHRlich'S CARCINOMA IN RATS

**Kryzhanovskaya E.A., Yukina G.Yu., Belyaev M.A., Zakharenko A.A., Rybalchenko V.A.,  
Tomson V.V., Sukhorukova E.G., Paltyshev I.A., Vervekin I.V.**

*Pavlov First Saint-Petersburg State Medical University, Saint-Petersburg, e-mail: pipson@inbox.ru*

A study of the method of aerosol intraperitoneal chemotherapy under pressure on the line of Wistar peritoneal carcinomatosis transplanted to rats was carried out. Peritoneal carcinomatosis was modeled using a strain of ovarian tumor. For the development of peritoneal carcinomatosis animals were intraperitoneal injected  $1 \times 10^7$  tumor cells. After fixation of the material in 10% formalin and standard histological technique, the material of autopsies of rats with transplanted tumor without treatment and the material of biopsies and autopsies of rats with treatment by aerosol intraperitoneal chemotherapy under pressure with cisplatin were studied by light microscopy. Animals without treatment were died at 7-14 days. After treatment with aerosol intraperitoneal chemotherapy under pressure with cisplatin, the life expectancy of animals increased. Morphological analysis of autopsy material of treated animals showed that almost the entire omentum has a normal structure with mild inflammatory infiltration. Tumor tissue is observed in single tissue fragments in the form of small foci of homogeneous necrotic masses with an admixture of erythrocytes and single degenerative tumor cells. Thus, there is a development of partial regression of the tumor process with a decrease in the volume of tumor tissue in the abdominal cavity and significant decrease in the activity of the inflammatory process, which together led to an increase in the life expectancy of laboratory animals. However, the metastatic process (metastasis in the lymph node and tumor emboli in the vessels) was remained, contributing to tumor intoxication with the development of dystrophy of parenchymal organs.

**Keywords:** peritoneal carcinomatosis, carcinoma, aerosol intraperitoneal chemotherapy under pressure, cisplatin, morphological assessment

Канцероматоз брюшины является одним из наиболее неблагоприятных вариантов прогрессирования и рецидивирования злокачественных опухолей желудочно-кишечного тракта (ЖКТ). Длительное время развитие канцероматоза брюшины рассматривалось как терминальная стадия онкологического заболевания с медианой выжи-

ваемости 3–6 мес., при котором основным методом лечения оставалась лишь системная химиотерапия, несмотря на низкую ее эффективность, особенно при таких опухолях, как рак желудка. Перитонеальный канцероматоз (ПК) встречается у 14–43% пациентов с раком желудка [1, 2]. При этом из всей группы больных раком желудка

брюшина является единственным местом метастазирования для 35% пациентов [3]. Самой частой причиной смерти у пациентов с раком желудка является имплантационное метастазирование в брюшину. На момент постановки диагноза уже около 15–40% пациентов с раком желудка имеют перитонеальное распространение опухоли [4]. После проведения радикальной операции по поводу рака желудка отдаленные метастазы сохраняются у 25–50% пациентов [5–7]. Из всех случаев рецидивирования заболевания, в 35–45% причиной становится наличие ПК [6]. Хотя выживаемость после радикальной операции при раке желудка незначительно повышается с помощью адьювантной или неoadьювантной химиотерапии [8, 9], но эти методики остаются безуспешными в снижении частоты метастазирования, включая развитие ПК [10, 11].

В настоящее время «золотым стандартом» паллиативного лечения опухолевого асцита и профилактики его возникновения у больных раком желудка с высоким риском развития ПК, а также для лечения пациентов с уже развившимся ПК в сочетании с циторедуктивной хирургией (ЦРХ) является внутрибрюшинная химиогипертермическая перфузия (ВБХГТП). Основной проблемой в лечении ПК является низкая проникаемость цитостатиков в опухолевые узлы, преимущественно за счёт высокоинтерстициального давления жидкости в последних. В связи с этим был предложен принципиально новый способ регионарной химиотерапии ПК – аэрозольная внутрибрюшинная химиотерапия под давлением (АВХД), при котором в брюшной полости в условиях карбоксиперитонеума с помощью специальных устройств создаётся аэрозоль из химиопрепарата с последующей экспозицией [12]. Новая методика позволяет при меньших дозах химиопрепарата и широким возможностях к повторным процедурам уменьшить диссеминацию перитонеальных очагов, что в дальнейшем может позволить провести циторедуктивную операцию и ВБХГТП.

Цель исследования: морфологическая оценка применения аэрозольной внутрибрюшинной химиотерапии под давлением (АВХД) с использованием цисплатина при развитии карциноматозе на модели экспериментального животного.

#### Материалы и методы исследования

Исследование проведено на крысах линии Вистар возрастом 3–3,5 месяца с массой тела 340–400 г. Для моделирования перитонеального канцероматоза использован штам опухоли яичника. Опухоль предварительно перевивали внутрибрюшинно 5 крысам,

которые использовались в качестве доноров опухолевых клеток. На 7-й день со времени перевивки развившийся асцит перевивали от крыс-доноров здоровым крысам внутрибрюшинно. Для развития ПК животным вводили внутрибрюшинно  $1 \times 10^7$  опухолевых клеток. Экспериментальных животных разделили на две группы. В первой группе (Гр I) заражённых животных оставляли без лечения ( $n = 5$ ), животных во второй группе (Гр II) на 5-е сут после заражения лечили методом аэрозольной внутрибрюшинной химиотерапии под давлением (АВХД) цисплатином ( $n = 4$ ). Перед лечением у животных брали биопсию сальника и брыжеечные лимфатические узлы для подтверждения опухолевого процесса, развитие асцита подтверждали цитологическим исследованием.

Животные в Гр I без лечения прожили от 7 суток до 14 суток. У погибших животных забирали аутопсийный материал: солидные пласты опухоли с брюшины, фрагменты брюшины, мышечную ткань передней брюшной стенки, большой и малый сальник, поджелудочную железу с парапанкреатической жировой клетчаткой, печень, почку.

Животные после лечения погибли на 30 сут ( $n = 3$ ), одна крыса была выведена из эксперимента на 40 сут после лечения. У животных забирали аутопсийный материал: брыжеечные лимфатические узлы, сальник, печень, почку, поджелудочную железу, мышцы передней брюшной стенки с брюшиной. Все эксперименты *in vivo* выполнены в соответствии с правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных (принципы Европейской конвенции, Страсбург, 1986 г., и Хельсинкская декларация Всемирной медицинской ассоциации о гуманном обращении с животными, 1996 г.).

Биопсийный и аутопсийный материал фиксировали в 10% нейтральном формалине на фосфатном буфере (рН 7,4) не менее 24 ч. Для получения сопоставимых результатов образцы от всех животных обрабатывали параллельно и в одинаковых условиях. После формалиновой фиксации, используя стандартную гистологическую методику со спиртами возрастающей концентрации, материал заливали в парафиновые блоки. Срезы толщиной 5 мкм готовили с помощью микротомы Accu-Cut SRT 200 (Sakura, Япония), окрашивали гематоксилином и эозином. Микроскопический анализ проводили на световом микроскопе Leica DM750 (Германия) при увеличении в 100 и 400 раз. Фотосъёмку гистологических объектов выполняли, используя цифровую микрофотокамеру ICC50 (Leica, Германия).

#### Результаты исследования и их обсуждение

У животных Гр I в аутопсийном материале выявлены имплантированные на сальник опухолевые клетки, имеющие солидный тип роста и образующие экзофитные узлы, покрытые соединительнотканной капсулой. Отметим, что инвазии вглубь сальника не отмечаются. В опухолевых узлах клетки располагаются группами, окруженными тонкими соединительнотканными прослойками (рис. 1). Опухолевые клетки имеют округлую и овальную форму с центрально или эксцентрично расположенным крупным гиперхромным ядром. Цитоплазма клеток

вакуолизирована вплоть до образования перстневидных клеток. Во всех фрагментах сальника отмечается оментит с образованием грануляционной ткани с выраженной инфильтрацией лимфоцитами, моноцитами, макрофагами, тучными клетками, в меньшей степени – полиморфно-ядерными лейкоцитами. В сосудах разного калибра определяются явления сладжа и стаза. Кровоизлияний и аррозий сосудов не отмечается. В мышечной ткани передней брюшной стенки отмечается инвазивный стелющийся рост опухолевой ткани, сопровождающийся отеком, дистрофическими изменениями мышечных волокон с их незначительной воспалительной инфильтрацией. Во фрагментах брюшины отмечается плотный воспалительный инфильтрат, состоящий из лимфоцитов, макрофагов, моноцитов, на фоне выраженного отека. Мезотелиоциты набухшие, с крупным ядром. В отдельных участках отмечается примыкание к брюшине некротизированной опухолевой ткани, представленной гомогенными эозинофильными массами, содержащими отдельные опухолевые крупные клетки с вакуолизированной цитоплазмой с крупным гипер- или гипохромным ядром, а также апоптотические тельца. Среди некротических масс выявляются лимфоциты и макрофаги. В печени наблюдаются признаки дистрофии гепатоцитов, в синусоидах выявляется большое число лимфоцитов, в сосудах разного калибра – стазы и сладжи, пристеночные фибриновые тромбы. В ветвях печеночной вены определяются отдельные опухолевые клетки. В паренхиме поджелудочной железы наблюдаются признаки дистрофии, в парапанкреатической

жировой клетчатке встречаются небольшие фокусы некротических масс с клетками в состоянии некробиоза и диффузная выраженная инфильтрация лимфоцитами, моноцитами и небольшим количеством сегментоядерных лейкоцитов.

Таким образом, животные в Гр I, оставленные без лечения, погибли от опухолевой интоксикации на 7–14 сут эксперимента.

В исследованном биопсийном материале Гр II брыжеечные лимфатические узлы с признаками гиперплазии. На грануляционной ткани сальника располагаются некротизированные опухолевые массы (рис. 2).

Биопсийный материал подтвердил, что на 5 сут после перевивки опухоли у животных развился перитонеальный карциноматоз, и АВХД начали проводить у больных крыс. После проведения АВХД продолжительность жизни крыс составила 30 суток, и одно животное вывели из эксперимента на 40 сутки после лечения.

В аутопсийном материале леченых животных практически все фрагменты сальника имеют обычное строение со слабо выраженной воспалительной инфильтрацией, небольшим числом гемосидерофагов и с образованием отдельных мелких плотных инфильтратов, состоящих преимущественно из лимфоцитов. Встречаются участки зрелой грануляционной ткани и фиброза (рис. 3). Опухолевая ткань наблюдается в единичных случаях в виде мелких фокусов гомогенных некротических масс с дегенеративными опухолевыми клетками. Затухание воспалительного процесса также наблюдается в парапанкреатической клетчатке. В лимфатических узлах выявляются признаки неспецифической гиперплазии.

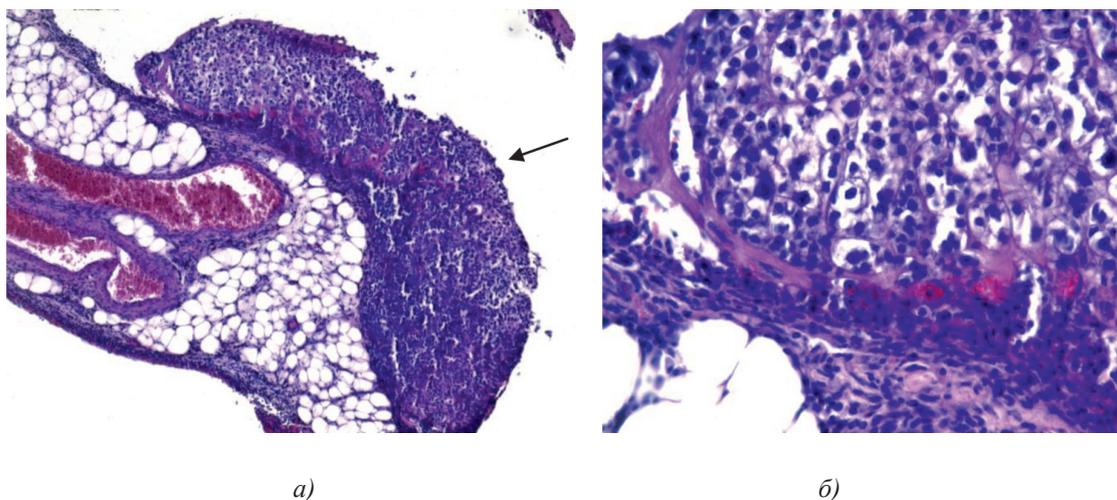
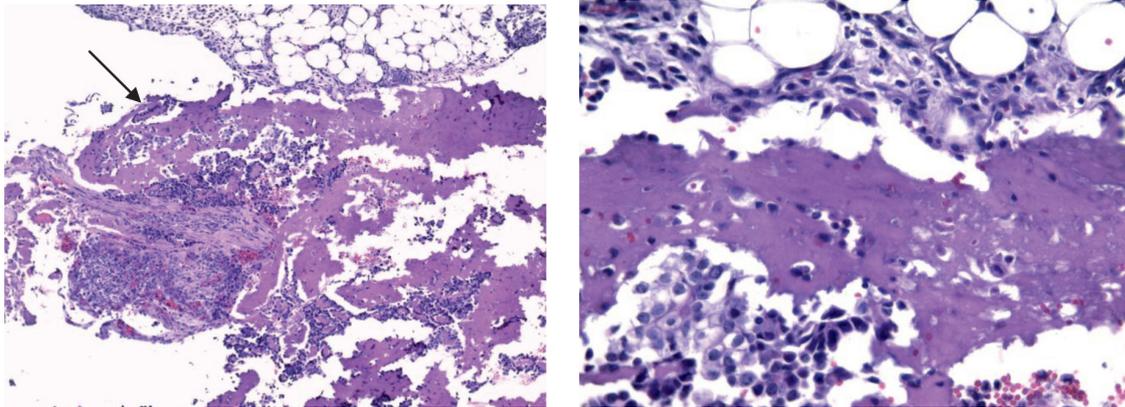


Рис. 1. Сальник с узлом карциномы (указан стрелкой), окраска гематоксилином и эозином. а) ок.  $\times 10$ , об.  $\times 10$ ; б) ок.  $\times 10$ , об.  $\times 10$



а)

б)

Рис. 2. Сальник с некрозом опухолевой ткани (указан стрелкой), окраска гематоксилином и эозином. а) ок.  $\times 10$ , об.  $\times 10$ ; б) ок.  $\times 10$ , об.  $\times 10$

Но стоит отметить, что в одном лимфатическом узле обнаружен тотальный метастаз карциномы без инвазии капсулы узла, состоящий из перстневидных клеток. В одном из фрагментов мышечной ткани передней брюшной стенки отмечается наличие опухолевых эмболов в сосудах венозного типа. В гепатоцитах выявлены признаки дистрофии, в синусоидных капиллярах диффузно располагается большое число лимфоцитов. В почке определяются признаки дистрофии эпителия извитых канальцев, в сосудах мелкого калибра наблюдаются фибриновые тромбы и стаз.

частичного регресса опухолевого процесса с уменьшением объема опухолевой ткани в брюшной полости и значительному снижению активности воспалительного процесса, что в совокупности привело к увеличению продолжительности жизни лабораторных животных. Однако сохранился метастатический процесс (метастаз в лимфатический узел и опухолевые эмболы в сосудах), также вносящий вклад в опухолевую интоксикацию с развитием дистрофии паренхиматозных органов.

Работа выполнена в рамках темы государственного задания, № госрегистрации АААА-А18-118112890037-9.

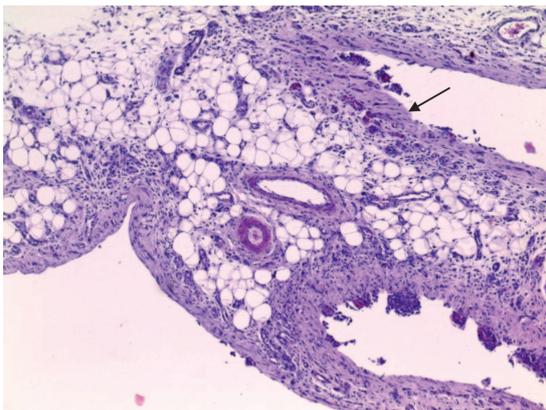


Рис. 3. Сальник после лечения АВХД с участками зрелой грануляционной ткани (указана стрелкой), окраска гематоксилином и эозином. Ок.  $\times 10$ , об.  $\times 10$

Таким образом, проведение АВХД на 5 сутки экспериментального перитонеального канцероматоза привело к развитию

### Список литературы

1. Thomassen I., van Gestel Y.R., van Ramshorst B., Luyer M.D., Bosscha K., Nienhuijs S.W., Lemmens V.E., de Hingh I.H. Peritoneal carcinomatosis of gastric origin: a population-based study on incidence, survival and risk factors. *Int. J. Cancer*. 2014. № 134. P. 622–628.
2. Sakuramoto S., Sasako M., Yamaguchi T., Kinoshita T., Fujii M., Nashimoto A., Furukawa H., Nakajima T., Ohashi Y., Imamura H., et al. Adjuvant chemotherapy for gastric cancer with S-1, an oral fluoropyrimidine. *N. Engl. J. Med.* 2007. № 357. P. 1810–1820.
3. Abbasi S.Y., Taani H.E., Saad A., Badheeb A., Addasi A. Advanced gastric cancer in Jordan from 2004 to 2008: a study of epidemiology and outcomes. *Gastrointest Cancer Res.* 2011. № 4. P. 122–127.
4. Thomassen I., van Gestel Y.R., van Ramshorst B., et al. Peritoneal carcinomatosis of gastric origin: a population-based study on incidence, survival and risk factors. *Int. J. Cancer*. 2014. № 134. P. 622–628.
5. Sakuramoto S., Sasako M., Yamaguchi T., For the ACTS-GC group, et al. Adjuvant chemotherapy for gastric cancer with S-1, an oral fluoropyrimidine. *N. Engl. J. Med.* 2007. № 357. P. 1810–1820.
6. Roviello F., Marrelli D., de Manzoni G., on behalf of the Italian Research Group for Gastric Cancer, et al. Prospective

study of peritoneal recurrence after curative surgery for gastric cancer. *Br. J. Surg.* 2003. № 90. P. 1113–1119.

7. Cunningham D., Allum W.H., Stenning S.P., MAGIC Trial Participants, et al. Perioperative chemotherapy versus surgery alone for resectable gastroesophageal cancer. *N. Engl. J. Med.* 2006. № 355. P. 1–20.

8. Bang Y.J., Kim Y.W., Yang H.K., CLASSIC Trial Investigators, et al. Adjuvant capecitabine and oxaliplatin for gastric cancer after D2 gastrectomy (CLASSIC): a phase 3 open-label, randomised controlled trial. *Lancet.* 2012. № 379. P. 315–321.

9. Smalley S.R., Benedetti J.K., Haller D.G., et al. Updated analysis of SWOG-directed intergroup study 0116: a phase III trial

of adjuvant radiochemotherapy versus observation after curative gastric cancer resection. *J. Clin. Oncol.* 2012. № 30. P. 2327–2333.

10. Xiong B., Ma L., Cheng Y., et al. Clinical effectiveness of neoadjuvant chemotherapy in advanced gastric cancer: an updated meta-analysis of randomized controlled trials. *Eur. J. Surg. Oncol.* 2014. № 40. P. 1321–1330.

11. Cao J., Qi F., Liu T. Adjuvant chemotherapy after curative resection for gastric cancer: a meta-analysis. *Scand. J. Gastroenterol.* 2014. № 49. P. 690–704.

12. Reymond M.A. Intraperitoneal Chemotherapy of Peritoneal Carcinomatosis Using Pressurized Aerosol as an Alternative to Liquid Solution: First Evidence for Efficacy. *Ann. Surg. Oncol.* 2014. Vol. 21. P. 553–559.